

穿透支原体 P35 蛋白细胞粘附活性研究

朱翠明,余敏君,曾焱华,游晓星,吴移谋

(南华大学微生物学与免疫学教研室,湖南 衡阳 421001)

摘要: **目的** 研究穿透支原体(Mpe)P35 蛋白的细胞粘附活性。 **方法** IPTG 诱导 pQE31/p35 原核表达载体在 E. coli 中表达,用 Ni-NTA Spin 亲和纯化,Western blot 鉴定表达产物。通过间接免疫荧光试验(IFA)、竞争抑制试验研究 rP35 对 HeLa 细胞的粘附活性。 **结果** pQE31/p35 在 E. coli 中表达出分子量约 35 kDa 的蛋白质,Western blot 鉴定其为特异性 rP35 蛋白。IFA 发现 rP35 对 HeLa 细胞无明显的粘附活性;竞争抑制试验表明 rP35 不能抑制 Mpe 粘附 HeLa 细胞。 **结论** P35 可能不是 Mpe 的主要粘附分子。

关键词: 穿透支原体; P35 蛋白; 细胞粘附

中图分类号:R375 **文献标识码:**A

Studies on Cyto-adherence of the Mycoplasma Penetrans P35

ZHU Cuiming, YU Minjun, ZENG Yanhua, et al

(Department of Microbiology and Immunology, University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China)

Abstract: **Objective** To study the adherence of M. penetrans 35kDa Lipid associated membrane protein (P35). **Methods** pQE31/p35, a prokaryotic expression recombinant, was constructed. Expression of recombinant P35 protein (rP35) was induced by IPTG in E. coli. rP35 purified with Ni-NTA Spin Kit was analyzed by Western blot. Indirect immunofluorescence assay (IFA) and competitive inhibition test were used to analyze the adherence of rP35 to HeLa cells. **Results** rP35 fusion protein with a calculated molecular mass of 35kDa was expressed in E. coli. IFA showed that rP35 could not adhere to HeLa cells. The competitive inhibition test also showed that rP35 was not able to inhibit M. penetrans adhering to HeLa cells. **Conclusion** Probably P35 is not the main adhesin of M. penetrans.

Key words: Mycoplasma penetrans; P35; adherence

支原体是一类能在无活细胞的人工培养基上生长繁殖的最小微生物。它广泛分布于自然界,与人类、动物和植物的疾病有密切的关系。可引起原发性非典型肺炎、支气管炎、非淋菌性尿道炎、子宫内膜炎等疾病。支原体对宿主组织和细胞的粘附,是支原体致病的关键。若通过突变使支原体失去粘附能力,则支原体的感染性也随之消失。因此,粘附是支原体致病的起始步骤,研究支原体粘附分子,对预

防、控制支原体感染有重要意义。穿透支原体(Mycoplasma penetrans, Mpe)是一种新发现的艾滋病相关支原体^[1-2]。目前发现其也可引起 AIDS 相关尿道疾病和呼吸道疾病,并与消化道和生殖道肿瘤发生相关^[3-6]。Mpe 能粘附到多种组织细胞上,其细胞表面特殊顶端结构中的脂质相关膜蛋白(LAMPs)是 Mpe 粘附的物质基础。其中 P35 是 Mpe 的主要表面抗原,广泛分布在细胞膜表面^[7]。通过其 N-末端酰基部分锚定于细胞膜脂质双层。P35 不仅分布在 Mpe 顶端结构中,且广泛分布于细胞膜表面。而人型支原体的 P50 粘附素和发酵支原体的 P29 粘附素也是分布于整个细胞表面。推测 P35 可能是 Mpe 的粘附分子,与 Mpe 的粘附有关^[8-9]。但到目前为止,尚未见 P35 相关功能的研究报道。为了解 P35 蛋白是否是 Mpe 的主要粘附分子,本研究将 p35 基

收稿日期:2013-02-27

基金项目:国家自然科学基金(81072418/H1005)和湖南省教育厅重点实验室(2012 年)项目。

作者简介:朱翠明,博士,副教授,硕士生导师,研究方向:肺炎支原体致病机制与防治的研究,E-mail:cuiming_zhu@yahoo.com.cn. 通讯作者吴移谋,教授,博士生导师,研究方向:肺炎支原体致病机制与防治的研究,E-mail:yimouwu@sina.com.cn.

因克隆至 pQE31 原核细胞表达载体,在大肠杆菌中进行诱导表达,用纯化的重组 P35 蛋白(rP35)研究其对 HeLa 细胞的粘附作用,为 Mpe 致病机制提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

Mpe GTU-4 从南京东南大学公共卫生学院赵季文老师处购置,原核表达载体 pQE31 为本室保存。

1.2 菌株、细胞株和质粒

Mpe GTU-4 接种于含多粘菌素和青霉素的改良 SP4 液体培养基中,37 °C 培养 3 ~ 7d。HeLa 细胞培养在含 10% 小牛血清、100 U/mL 青霉素、0.1 μg/mL 链霉素的达尔伯氏改良培养基(Dulbecco's modified essential medium, DMEM)中,在 37 °C、5% CO₂ 条件下培养。大肠杆菌 M15 培养于 LB 培养基中。

1.3 rP35 蛋白的表达、纯化与鉴定

pQE31/p35 原核细胞表达载体的构建和鉴定见文献^[10]。将 2.5 mL 过夜培养物加入含 100 μg/mL 氨苄青霉素和 25 μg/mL 卡那霉素的 150 mL LB 培养液中,37 °C 振荡培养至 OD₆₀₀ = 0.6 时,加入 IPTG (终浓度为 1 mmol/L),37 °C 振荡培养 4 h。用 Ni-NTA Spin Kit(Qiagen 公司)纯化 pQE31/p35 重组表达产物 rP35,纯化物经 SDS-PAGE,转化 NC 膜后,用 Western blot 鉴定 rP35,一抗为小鼠抗 Mpe 抗体(Santa Cruz),二抗为 HRP 标记的抗小鼠 IgG,加 ECL 试剂(Amersham Biosciences),X 线片曝光显影。

1.4 Mpe 对 HeLa 细胞的粘附试验

取 10 mL Mpe 培养物,9 000 g 离心 10 min 后重悬于 1 mL PBS-BSA(3% BSA),加入 10 μL 1 mmol/L DiIC₁₈,振荡混匀,37 °C 孵育 60 min。离心 9 000 g × 2 min,弃上清。然后再加入 1 mL PBS-BSA(含 1% DMSO),离心 9 000 g × 2 min,洗涤 2 次。将 Mpe 沉淀重悬于 PBS-BSA,使 Mpe 终浓度为 10⁹ CFU/mL^[10]。将培养的 HeLa 细胞用 DMEM 培养基调整细胞数至 1 × 10⁵/mL,铺入置有无菌盖玻片的 24 孔板,每孔 0.5 mL,5% CO₂ 中 37 °C 培养过夜。第二天弃去培养基,用 PBS-BSA 洗涤 2 次后用多聚甲醛室温固定 15 min,然后用 PBS 洗涤 5 次,每次 3 min。在每孔细胞中加入 150 μL 1:10 稀释的 DiIC₁₈ 标记的 Mpe^[11],22 °C 孵育 120 min。盖玻片用 PBS 洗涤 5 次,每次 3 min,干

燥后置荧光显微镜观察并记录结果。

1.5 rP35 对 HeLa 细胞的粘附试验

HeLa 细胞的培养及准备同上,在已用多聚甲醛固定的 HeLa 细胞中每孔加入 150 μL 5 μmol/L 纯化的 rP35^[11],22 °C 孵育 60 min。用 PBS-BSA 洗涤 5 次,每次 3 min。然后加入 100 μL 1:1 000 稀释的小鼠抗 Mpe,37 °C 孵育 60 min,用 PBS-BSA 洗涤 5 次,每次 3 min。再加入 150 μL 1:1 000 稀释的 FITC 标记的羊抗小鼠 IgG,37 °C 孵育 60 min,用 PBS 洗涤 5 次,每次 3 min。取出盖玻片,干燥,荧光显微镜观察记录结果。

1.6 rP35 与 Mpe 竞争结合 HeLa 细胞试验

HeLa 细胞的培养及准备同上,在已用多聚甲醛固定的 HeLa 细胞中每孔加入 150 μL 5 μmol/L 纯化的 rP35,22 °C 孵育 60 min,用 PBS-BSA 洗涤 5 次,每次 3 min。再加入 150 μL 1:10 稀释的 DiIC₁₈ 标记的 Mpe,22 °C 孵育 120 min,然后用 PBS 洗涤 5 次,每次 3 min。取出盖玻片,干燥后荧光显微镜观察记录结果。

2 结 果

2.1 重组 P35 蛋白的表达、纯化和鉴定

pQE31/p35 可表达其相对分子质量约 35 kDa 的目的蛋白 rP35,经 Ni-NTA Spin 亲和纯化后,得到 Mr 约 35 kDa 的单一一条带(图 1)。Western blot 鉴定目的蛋白为 rP35(图 2)。

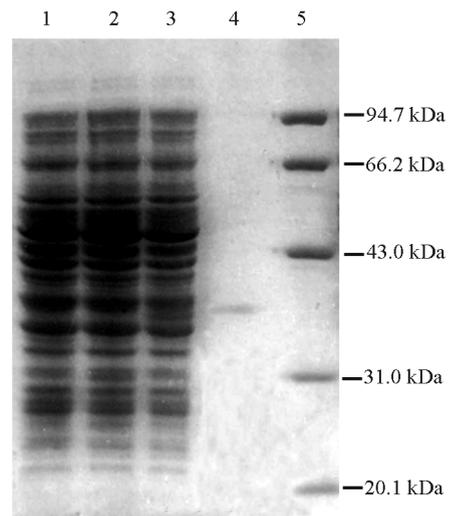


图 1 pQE31/p35 在大肠杆菌中表达及纯化产物的 SDS-PAGE 分析 1: IPTG 诱导的含 pQE31 的 M15 裂解液; 2: IPTG 未诱导的含 pQE31/p35 裂解液; 3: IPTG 诱导的含 pQE31/p35 的 M15 裂解液; 4: 纯化的 rP35; 5: 低分子量蛋白 markers

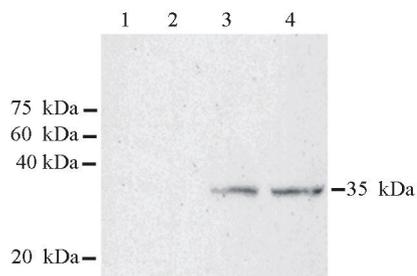


图 2 rP35 表达及纯化产物的 Western blot 鉴定 1: E. coli M15; 2: IPTG 诱导的含 pQE31 的 M15 裂解液; 3: IPTG 诱导的含 pQE31/p35 的 M15 裂解液; 4: 纯化的 rP35

2.2 Mpe 对 HeLa 细胞的粘附

将 DiIC₁₈ 染色的 Mpe 与 HeLa 细胞一起孵育, 荧光显微镜观察, 发现 HeLa 细胞上吸附了大量的荧光染料, 发桔黄色荧光, 表明 Mpe 对 HeLa 细胞有强烈的粘附作用(图 3)。且观察发现, 部分 Mpe 在 30 min 内即可粘附到 HeLa 细胞上, 随着时间延长, 粘附在 HeLa 细胞上的 Mpe 数量增加, 约 120 min 达到饱和。

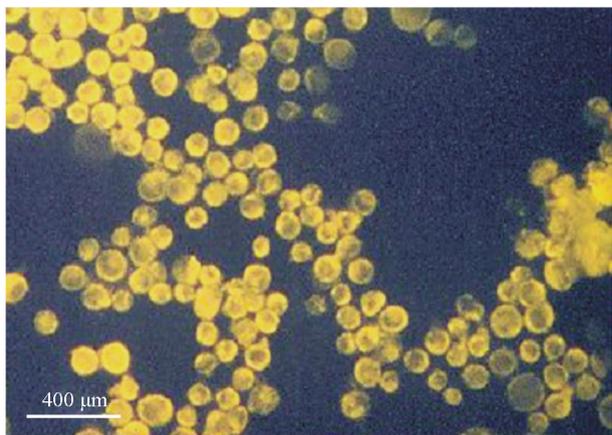


图 3 Mpe 对 HeLa 细胞的粘附作用 (×100)

2.3 IFA 检测 rP35 对 HeLa 粘附细胞作用

用纯化的 rP35 进行 IFA, 荧光显微镜下仅见一些小的黄绿色荧光颗粒, 与阴性对照结果基本相同(图 4), 表明 rP35 未粘附到 HeLa 细胞上, 即 P35 对 HeLa 细胞无明显粘附作用。

2.4 竞争抑制试验检测 rP35 对 HeLa 细胞的粘附作用

竞争抑制试验结果发现, 加入 rP35 后, Mpe 对 HeLa 细胞的粘附活性无明显减弱, Mpe 仍能强烈粘

附至 HeLa 细胞上, 使 HeLa 细胞染上桔黄色 DiIC₁₈ 荧光染料。与阴性对照结果基本相同(图 5), 表明 rP35 不能抑制 Mpe 对 HeLa 细胞的粘附。

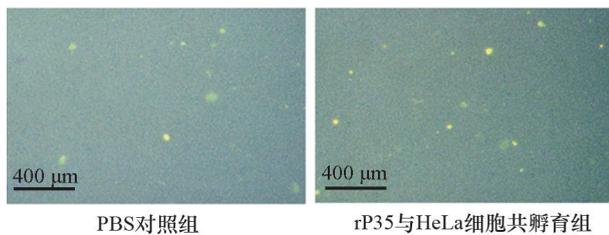


图 4 IFA 检测 rP35 对 HeLa 细胞的粘附活性 (×100)

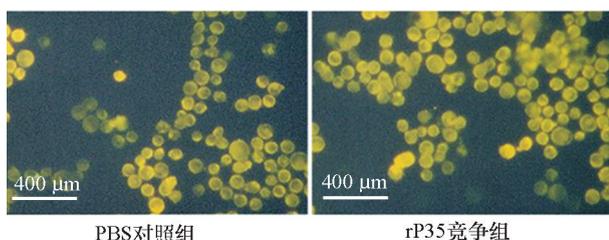


图 5 竞争抑制试验检测 rP35 对 HeLa 细胞的粘附 (×100)

3 讨 论

目前, 对肺炎支原体和生殖道支原体粘附分子的研究报道较多。肺炎支原体的主要粘附分子为 P1 和 P30。此外, 85 kDa, 37 kDa, 72 kDa 膜蛋白及 HMW1~5 也与肺炎支原体粘附有关; 生殖道支原体的主要粘附分子为 Pa, P32 为其粘附辅助蛋白。但未见对 Mpe 粘附分子研究的相关报道。

P35 位于 Mpe 细胞膜表面, 是 Mpe 的主要表面抗原, 我们采用 IFA 研究发现用亲脂性荧光染料 Di-IC₁₈ 染色的 Mpe 对 HeLa 细胞由很强的粘附作用, 但 rP35 既不能粘附至 HeLa 细胞, 也不能抑制 Mpe 对 HeLa 细胞的粘附, 表明 rP35 对 HeLa 细胞无明显的粘附活性。

P35 广泛分布在细胞膜表面^[7], 而不是集中分布在 Mpe 顶端结构中。这与一些支原体的粘附分子不同, 如: 肺炎支原体的 P1、P30、P90、HMW3 和生殖支原体的 Pa, 它们主要集中分布在顶端结构中。而且我们的间接免疫荧光和竞争抑制实验结果表明, rP35 对 HeLa 细胞无明显的粘附作用, 所以, P35 可能与 Mpe 的粘附活性无关, 不是 Mpe 的粘附

分子。

但是,本研究结果也不能排除 P35 对细胞有粘附活性,一方面,本研究对其粘附活性的研究是通过原核细胞表达的 rP35 纯化蛋白来代替 P35 进行的,用 IPTG 在大肠杆菌中诱导表达的 rP35,其分子构型可能发生改变,失去其生物学活性;而且,本研究用 Ni 亲和柱来纯化 rP35,很可能得不到有生物活性的蛋白质。另一方面,P35 可能需要某种特殊辅助粘附分子共同作用,才能发挥其粘附作用,单独的 P35 抗原无法粘附到细胞上。如:肺炎支原体 HMW 辅助蛋白若发生突变,则 P1 不簇集于尖端,也不引起地鼠发病^[13]。P32 是保持生殖支原体粘附性的一个必需蛋白,经自发突变或经转座子 Tn4001 产生的 P32 缺失的突变株不能粘附红细胞^[14]。不能表达 mg218 的生殖支原体突变株表现出 P140/P110 的不稳定性,且不能粘附到宿主细胞上,但只要能表达 mg218 羧基部分的突变株却仍能保持其粘附表型^[15]。此外,本实验是用 Mpe 的抗体做粘附抑制试验,而非用特异性 P35 单克隆抗体进行粘附阻断,可能也会导致实验出现阴性结果。

P35 是否为 Mpe 的主要粘附分子? Mpe 的 LAMPs 中究竟哪些蛋白与粘附有关? 目前仍未清楚。为进一步研究 P35 是否为 Mpe 的粘附分子,一方面,我们考虑直接从 Mpe 的膜蛋白中提取 P35 脂蛋白进行粘附活性研究,另一方面,本研究将制备 P35 的单克隆抗体,用粘附阻断试验来研究 P35 的粘附活性。而且,在今后的研究中,本研究将提取 Mpe 的其他 LAMPs 成分,进行粘附活性研究,以确定 Mpe 的粘附分子,探索 Mpe 的致病机制。

参考文献:

[1] Lo SC, Hayes MM, Wang RY, et al. Newly discovered mycoplasma isolated from patients infected with HIV [J]. Lancet, 1991, 338(8780): 1415-1418.

[2] Wang B, Wu JR, Guo HJ, et al. The prevalence of six species of Mycoplasmataceae in an HIV/AIDS population in Jiangsu Province, China [J]. Int J STD AIDS, 2012, 23(8): e7-10.

[3] Yaez A, Cedillo L, Neyrolles O, et al. Mycoplasma penetrans bacteremia and primary antiphospholipid syndrome [J]. Emerg Infect Dis, 1999, 5(1): 164-167.

[4] Jiang X, Lv YQ, Zhang JN, et al. Mycoplasma penetrans

infection is a potential cause of immunoglobulin A nephropathy: a new animal model [J]. J Nephrol, 2012, 26(3): 470-475.

- [5] Zhang S, Wear DJ, Lo S. Mycoplasmal infections alter gene expression in cultured human prostatic and cervical epithelial cells [J]. FEMS Immunol Med Microbiol, 2000, 27(1): 43-50.
- [6] Liu WB, Zhang JZ, Jiang BH, et al. Lipoprotein p37 from Mycoplasma hyorhinis inhibiting mammalian cell adhesion [J]. J Biomed Sci., 2006, 13(3): 323-331.
- [7] Neyrolles O, Eliane JP, Ferris S, et al. Antigenic characterization and cyto-localization of P35, the major Mycoplasma penetrans antigen [J]. Microbiology, 1999, 145(Pt2): 343-355.
- [8] Giron JA, Lange M, Baseman JB. Adherence, fibronectin binding, and induction of cytoskeleton reorganization in cultured human cells by Mycoplasma penetrans [J]. Infect Immun, 1996, 64(1): 197-208.
- [9] Lo SC, Hayes MM, Kotani H, et al. Adhesion onto and invasion into mammalian cells by Mycoplasma penetrans: a newly isolated mycoplasma from patients with AIDS [J]. Mod Pathol, 1993, 6(3): 276-280.
- [10] 朱翠明, 吴移谋, 万艳平, 等. 穿透支原体 P35 蛋白对细胞因子的诱生作用 [J]. 中华微生物学与免疫学杂志, 2004, 24(9): 707-710.
- [11] Spencer A, Leigh, Kim S. Wise. Identification and functional mapping of the Mycoplasma fermentans P29 adhesin [J]. Infect Immun, 2002, 70(9): 4925-4935.
- [12] Bové JM. Molecular features of mollicutes [J]. Clin Infect Dis, 1993, 17(Suppl 1): S10-S31.
- [13] Schmidl SR, Gronau K, Hames C, et al. The stability of cytoadherence proteins in Mycoplasma pneumoniae requires activity of the protein kinase PrkC [J]. Infect Immun, 2010, 78(1): 184-192.
- [14] Pich OQ, Burgos R, Querol E, et al. P110 and P140 cytoadherence-related proteins are negative effectors of terminal organelle duplication in Mycoplasma genitalium [J]. PLoS One, 2009, 4(10): e7452.
- [15] Burgos R, Pich OQ, Ferrer-Navarro M, et al. Mycoplasma genitalium P140 and P110 cytoadhesins are reciprocally stabilized and required for cell adhesion and terminal-organelle development [J]. J Bacteriol, 2006, 188(24): 8627-8637.

(此文编辑:秦旭平)